WELTORGANISATION FÜR GEISTIGES EIGENTUM Internationales Büro

INTERNATIONALE ANMELDUNG VERÖFFENTLICHT NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE

INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS (PCT) (11) Internationale Veröffentlichungsnummer: WO 00/25839 (51) Internationale Patentklassifikation 7 : **A1** A61L 27/36 (43) Internationales 11. Mai 2000 (11.05.00) Veröffentlichungsdatum: (81) Bestimmungsstaaten: CA, CZ, IL, KR, NO, TR, US, ZA, PCT/EP99/08056 (21) Internationales Aktenzeichen: europäisches Patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE). (22) Internationales Anmeldedatum: 25. Oktober 1999 (25.10.99) Veröffentlicht (30) Prioritätsdaten: Mit internationalem Recherchenbericht. 29. Oktober 1998 (29.10.98) DE 198 49 984.1 (71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten ausser US): TU-TOGEN MEDICAL GMBH [DE/DE]; Industriestrasse 6, D-91077 Neunkirchen am Brand (DE). (72) Erfinder; und (75) Erfinder/Anmelder (nur für US): KÜBLER, Norbert [DE/DE]; Auf der Schanz 62, D-97076 Würzburg (DE). (74) Anwalt: MANITZ, FINSTERWALD & PARTNER GBR; Postfach 22 16 11, D-80506 München (DE).

- (54) Title: METHOD FOR PREPARING BONE MATERIAL
- (54) Bezeichnung: VERFAHREN ZUR PRÄPARATION VON KNOCHENMATERIAL

(57) Abstract

The invention relates to a method for preparing bone material. According to said method, the demineralized bone material is subjected to an autolytic decomposition and an extraction of its cellular components while at the same time its osteoinductive matrix proteins are maintained. To this end, the bone material is incubated in a phosphate buffer solution in combination with a mixture of enzyme inhibitors. The dwelling time in the buffer solution does not exceed 24 hours.

(57) Zusammenfassung

Bei einem Verfahren zur Praparation von Knochenmaterial wird das demineralisierte Knochenmaterial einem autolytischen Abbau sowie einer Extraktion seiner zellulären Komponenten unterworfen unter gleichzeitiger Erhaltung seiner osteoinduktiven Matrixproteine. Dies wird durch Inkubation in einer Phosphatpufferlösug in Kombination mit einer Mischung aus Enzyminhibitoren erreicht, wobei die Verweilzeit in der Pufferlösung 24 Stunden nicht überschreitet.

LEDIGLICH ZUR INFORMATION

Codes zur Identifizierung von PCT-Vertragsstaaten auf den Kopfbögen der Schriften, die internationale Anmeldungen gemäss dem PCT veröffentlichen.

| AL | Albanien | ES | Spanien | LS | Lesotho | SI | Slowenien |
|----|------------------------------|------|-----------------------------|----|-----------------------------|------|------------------------|
| AM | Arménien | FI | Finnland | LT | Litauen | SK | Slowakei |
| AT | Österreich | FR | Frankreich | LU | Luxemburg . | SN | Senegal |
| ΑU | Australien | . GA | Gabun | LV | Lettland | SZ | Swasiland |
| AZ | Aserbaidschan | GB | Vereinigtes Königreich | MC | Monaco | TD | Tschad |
| BA | Bosnien-Herzegowina | GE | Georgien | MD | Republik Moldau | TG | Togo |
| ВВ | Barbados | GH | Ghana | MG | Madagaskar | TJ | Tadschikistan |
| BE | Belgien | GN | Guinea | MK | Die ehemalige jugoslawische | TM | Turkmenistan |
| BF | Burkina Faso | GR | Griechenland | | Republik Mazedonien | TR | Türkei |
| BG | Bulgarien | HU | Ungarn | ML | Mali | TT | Trinidad und Tobago |
| BJ | Benin | IE | Irland | MN | Mongolei | UA | Ukraine |
| BR | Brasilica | IL | Israel | MR | Mauretanien | UG | Uganda |
| BY | Belarus | 18 | Island | MW | Malawi | US | Vereinigte Staaten von |
| CA | Kanada | IT | Italien | MX | Mexiko | | Amerika |
| CF | Zentralafrikanische Republik | JP | Јарал | NE | Niger | UZ | Usbekistan |
| CG | Kongo | KE | Kenia | NL | Niederlande | VN | Vietnam |
| CH | Schweiz | KG | Kirgisistan | NO | Norwegen | YU · | Jugoslawien |
| CI | Côte d'Ivoire | KP | Demokratische Volksrepublik | NZ | Neuseeland | ZW | Zimbabwe |
| CM | Kamerun | | Korea | PL | Polen | | |
| CN | China | KR | Republik Korea | PT | Portugal | | |
| CU | Kuba | KZ | Kasachstan | RO | Rumanien | | |
| CZ | Tschechische Republik | ıc | St. Lucia | RU | Russische Föderation | | |
| DE | Deutschland | LI | Liechtenstein | SD | Sudan | | |
| DK | Dānemark . | LK | Sri Lanka | SE | Schweden | | |
| EE | Estland | LR | Liberia | SG | Singapur | | |

WO 00/25839 PCT/EP99/08056

Verfahren zur Präparation von Knochenmaterial

5

Die Erfindung bezieht sich auf die Präparation und Gewinnung von demineralisiertem Knochenmaterial, das zur Wiederherstellung bei knöchernen Defekten in der Chirurgie geeignet ist.

10

15

25

Die Verwendbarkeit demineralisierten Knochenmaterials ist bereits bekannt. 1965 beschrieb M. R. Urist das osteoinduktive Potential von demineralisiertem Knochen nach intramuskulärer Implantation im Tierexperiment. Dieses Knochenmaterial enthält eine oder mehrere osteoinduktiv wirksame Substanzen wie z.B. die sogenannten bone morphogenetic proteins (BMPs), die eine Knochenregeneration in einem knöchernen Defekt stimulieren können (Lit. Urist, M.R.: Bone Formation by Autoinduction. Science 150: 893,1965.).

20 Eine Verbesserung dieses osteoinduktiven Knochenmaterials wurde über die Jahre hinweg schrittweise erreicht. Durch die Erkenntnis, daß eine im phosphatgepufferten Medium geführte Aktivierung von endogenen Kno-

chenenzymen, die einen Abbau von osteoinduktiven Proteinen bewirken, durch verschiedene Enzyminhibitoren wie Natriumazid, Jodessigsäure,

Jodacetamid, N-Ethylmaleinimid, Phenylmethyl-sulfonylfluorid und p-Chlorquecksilberbenzoat, unterdrückt werden kann, ohne gleichzeitig die Autolyse von Knochenzellen zu beeinträchtigen, führte schließlich zu einem speziellen Herstellungsverfahren, mit dem ein sogenannter AAA-

Knochen, ein autolysierter, Antigen extrahierter, allogener Knochen, präpariert werden konnte (vgl. Kübler N., et al., J.Oral Maxillofac. Surg., 51: 1346-1357, 1993.). Dieser AAA-Knochen hat bei gleichzeitig reduzierter Allo-Antigenität osteoinduktive Eigenschaften. Die Reduzierung der antigenen Eigenschaften wird durch Behandlung der zellulären Bestandteile durch Autolyse sowie deren Extraktion mit Chloroform-Methanol erreicht. Hierbei wird Knochenmaterial, das einem Verfahren zur Herstellung als AAA-Knochen unterzogen wird, aus Verstorbenen gewonnen.

Die Gewinnung des Ausgangsmaterials für das demineralisierte Kno-10 chenmaterial aus Verstorbenen ist durch den Einfluß von nach dem Tode einsetzenden Zersetzungsvorgängen beschränkt. Diese Autolyse setzt unmittelbar post mortem ein und zerstört die für die beabsichtigte Wirkung des Ersatzmaterials erforderlichen Wirksubstanzen im entnommenen Knochen. Eine Gewinnung von geeignetem Knochen ist damit bislang nur unmittelbar bzw. wenige Stunden post mortem möglich, wie z.B. aus Multiorganspendern. Die Zahl an Multiorganspendern ist sehr gering und erlaubt keine Gewinnung von Ausgangsmaterial für Material im Sinne der Erfindung mit dem Zwecke einer zuverlässigen und gesicherten Versorgung von Chirurgen. Andere Verstorbene kommen darüber hinaus als 20 Spender praktisch nicht in Frage, da das Einholen einer Erlaubnis zur Gewebeentnahme innerhalb des kurzen Zeitfensters für eine Gewebeentnahme nicht möglich ist. Es konnte jedoch gezeigt werden, daß die Konzentration und die Wirksamkeit der das Knochenwachstum stimulierenden Substanzen unter bestimmten Umständen bis zu 24 Stunden post 25 mortem erhalten bleibt und dadurch eine Entnahme sowohl aus hirntoten Spendern wie aus normal Verstorbenen möglich ist.

Es ist die Aufgabe der vorliegenden Erfindung, ein verbessertes Verfahren zur Präparation von Knochenmaterial zu schaffen, das den Heilungsprozeß nach einer Implantation beschleunigt.

- Die Lösung dieser Aufgabe erfolgt durch die Merkmale des Anspruchs 1
 und insbesondere dadurch, daß die Verweilzeit des Knochenmaterials in
 der Pufferlösung 24 Stunden nicht überschreitet. Überraschenderweise
 hat sich nämlich herausgestellt, daß die bislang als vorteilhaft angesehene
 Verweilzeit von 72 Stunden weder erforderlich noch vorteilhaft ist, um das
 Knochenmaterial zu präparieren und um die für den Heilungsprozeß wesentlichen BMPs zu erhalten. Mit dem erfindungsgemäßen Verfahren wird
 die Verträglichkeit des Knochenmaterials im lebenden Gewebe des Empfängers des Knochenimplantates verbessert und die Wirksamkeit bzw.
 Freisetzung der im knöchernen Träger enthaltenen Substanzen, die eine
 Knochenregeneration in einem Knochendefekt stimulieren können, werden
 verbessert, wodurch eine beschleunigte Heilung erreicht wird.
- Erfindungsgemäß bleibt die natürlichen Knochensubstanz als Träger der Wirkstoffe und als Gerüstsubstanz zum biomechanisch korrekten Einbau weitgehend erhalten. Die vorliegende Erfindung verbessert die Behandlung des Leichenknochens jedoch derart, daß bestimmte Behandlungsschritte verkürzt und damit der Zeitverlauf des Abbaus der biologisch aktiven Inhaltsstoffe im Knochen vermindert werden.
- 25 Erfindungsgemäß besitzen die das Knochenwachstum stimulierenden, natürlichen Substanzen, die aus der Gerüstsubstanz des erfindungsgemäß behandelten Knochens erhalten werden, eine erhöhte Wirksamkeit gegenüber dem bisherigen Verfahren. Der Nachweis der verbesserten

Wirksamkeit erfolgt durch eine Implantationstest mit Ratten. Die Implantation des erfindungsgemäß behandelten Knochens in die Muskulatur von Ratten führt zur Erzeugung von Knochen- und Knorpelvorläuferzellen sowie zur Bildung von ausdifferenzierten Knochen- und Knorpelzellen. Die Bildung dieser Zellen ist semi-quantitativ auswertbar und ist durch die Menge bzw. durch den zeitlichen Anstieg der alkalischen Phosphataseaktivität ein Maß für die Aktivität der biologischen Inhaltsstoffe.

Weiter bleibt erfindungsgemäß die natürliche Knochensubstanz erhalten, die vom Empfängerorganismus als verträglich erkannt wird und im Verlaufe der Einheilung in körpereigenes Gewebe umgebaut wird. Ein wesentliches Element der Erfindung besteht dabei darin, daß die Chemikalien zur Bearbeitung des Ausgangsmaterials biologisch nicht stören und die Einheilung nicht behindern.

15

20

25

10

5

Gemäß der Erfindung bewirken die eingesetzten Chemikalien zur Demineralisierung der Gerüstsubstanz und zur Extraktion der zellulären Bestandteile gleichzeitig eine chemische Sterilisation, so daß eine akzidentelle Kontamination des Knochens durch Mikroben, entstanden im Verlaufe der Knochenentnahme oder während des Herstellungsverfahrens, durch das Behandlungsverfahren selbst beseitigt wird. Die Gewinnung des Knochens aus dem Leichenspender innerhalb einer 24-stündigen Frist erfolgt unter aseptischen Bedingungen. Damit kann eine Verkeimung durch Sporen im Spendergewebe ausgeschlossen werden. Eine Verkeimung durch vegetative Keime, wie sie in einem nachfolgenden Bearbeitungsverfahren zufällig oder durch nicht steril / aseptisch geführte Arbeitsgänge erfolgen kann, wird durch die verfahrensgemäße Anwendung der eingesetzten Chemikalien beseitigt. Eine terminale Sterilisation wie

z.B. durch Hitze oder Gas, wie sie zur Herstellung anderer pharmazeutischer Produkte eingesetzt wird, ist nicht obligatorisch, so daß die Inhaltsstoffe des demineralisierten Knochens vollständig erhalten werden können.

5

10

20

25

Vorteilhafte Ausführungsformen der Erfindung sind in der Beschreibung und in den Unteransprüchen beschrieben.

So beträgt bei einer ersten vorteilhaften Variante des erfindungsgemäßen Verfahrens die Verweilzeit nicht mehr als 10 Stunden, vorzugsweise etwa 6 Stunden. Durch eine solche, im Vergleich zum Stand der Technik drastisch reduzierte Verweilzeit in der Pufferlösung wird die biologische Aktivität des erhaltenen Knochenmaterials deutlich gesteigert, ohne daß es jedoch erforderlich oder vorteilhaft wäre, eine erhöhte Konzentration an Enzyminhibitoren zuzugeben. 15

Auch ist es vorteilhaft, wenn der Demineralisierung eine Entfettung vorausgeht. Hierbei ist jedoch eine Mischung aus Chloroform und Methanol als verwendetes Lösungsmittel physiologisch bedenklich, da bereits geringe Rückstände das Einheilungsverhalten beeinträchtigen können und darüber hinaus die Verwendungsmöglichkeit von Chloroform in einem pharmazeutischem Herstellungsverfahren aus arbeitsschutzrechtlichen Gründen mit erheblichen Beschränkungen verbunden ist. Der Ersatz des vorbekannten Entfettungsmittelgemisches Chloroform / Methanol durch andere Entfettungsmittel, z.B. Methanol allein, Chloroform allein, Ethanol, Äther, Azeton und andere Niedrigsieder und Gemische daraus bevorzugt Äther, ermöglicht eine verbesserte, rückstandsfreie Entfernung aus dem

15

25

Knochengewebe und eine verbesserte Verträglichkeit des Knochenersatzmaterials.

Besonders vorteilhaft ist es ferner, wenn das erhaltene Knochenmaterial am Ende der Prozeßfolge einer Gamma-Sterilisation unterworfen wird, da hierdurch ohne Einfluß auf die biologische Aktivität eine Sterilisierung des Materials erfolgen kann.

Nachfolgend wird die vorliegende Erfindung beispielhaft anhand einer vorteilhaften Ausführungsvariante beschrieben. 10

Bei dem erfindungsgemäßen Verfahren zur Präparation von Knochenmaterial sowie der Herstellung von knöchernen Defekten in der Chirurgie wird zunächst humaner, kortikaler Knochen, z.B. vom Ferrur, Tibia, Humerus oder kortikaler Knochen des Beckenkamms sowie des Craniums von geeigneten Spendern unter sterilen Bedingungen innerhalb von 6 Stunden post mortem und bei -80°C gelagert. Der gefrorene Knochen wird zur Bearbeitung in sterilem Wasser mit 2 mmol/l Natriumazid aufgetaut. Das Natriumazid dient als Enzyminhibitor um einen Abbau der osteoin-20 duktiven Knochenmatrixproteine zu unterbinden. Die Knochenenden bzw. Gelenkansätze werden entfernt und der Knochen wird befreit von anhaftendem, nicht ossärem Gewebe und eventuell vorhandenes Knochenmark wird entfernt. Für Zwischenlagerungen während dieses Vorgangs wird der Knochen in destilliertem Wasser mit 2 mmol/l Natriumazid, 2 mmol/l N-Ethylmaleinimid und 0,1 mmol/l Benzamidin-Hydrochlorid bei 4°C gelagert und auf diese Weise eine enzymatische Aktivität unterbunden. Alternativ kann die Lagerung beispielsweise auch in 10 mmol/l Natriumazid und 3mmol/l N- Ethylmaleinimid bei 4°C erfolgen.

Anschließend erfolgt eine Entfettung in einem Chloroform/Methanol-Gemisch (1:1) bei Raumtemperatur über etwa 4 Stunden.

Nach einer Verdampfungszeit (Evaporierungszeitraum) von etwa 1 Stunde wird der Knochen zur Demineralisation in 0,6 mol/l Salzsäure bei 4°C eingelegt. Der Grad der Demineralisation ist abhängig von der Zeitdauer und dem Verhältnis zwischen dem mineralischen Gewicht und dem Volumen der Salzsäure. Dauer der Salzsäurebehandlung und damit Grad der Demineralisation liegen zwischen wenigen Stunden für eine Oberflächendemineralisierung und bis zu 30 Stunden für eine vollständige Demineralisation. Dabei löst die Salzsäure auch säurelösliche Proteine heraus wie Knochen-Sialoprotein, Osteopontin, Osteonectin, Osteocalcin, und Thrombospondin. Die Behandlung mit Salzsäure ermöglicht die Diffusion der BMPs in das Empfängergewebe post implantauonem und erleichtert Osteoinduktion und Resorption durch Makrophagen und Osteoklasten.

Nach der Demineralisation wird der Knochen erneut einer Säuberung auf eventuelle Gewebereste auf der Knochenoberseite unterzogen und in sterilem, destilliertem Wasser bei 4°C für 30 - 60 Minuten gewaschen. Durch Inkubation in 0,1 mol/l Phosphat-Puffer, pH 7,4, mit 3 mmol/l N-Ethylmaleinimid und 10 mmol/l Natriumazid zur Erhaltung der osteoinduktiven Matrixproteine wird ein autolytischer Abbau der Knochenzellen durchgeführt. Die Behandlung erfolgt bei 37°C unter Schütteln über etwa 6 Stunden in einem Wasserbad. Ein Wechsel der Pufferlösung kann erfolgen. Anschließend wird der Knochen in sterilem, deionisiertem Wasser für 2 bis 4 Stunden bei 4°C gerührt. Das Wasser wird für diesen Vorgang zweimal gewechselt.

20

Es folgt eine Schrumpfung der Kollagenfibrillen und die Extraktion hochmolekularer Proteoglykane mittels 6 mol/l Lithiumchlorid sowie die Extraktion von Protein-Polysacchariden mit geringem Molekulargewicht wie Biglykanen, Dekorin, Fibromodulin etc. durch 0,3 mol/l Calciumchlorid. Die Lösung enthält 3 mmol/l Natriumazid und die Extraktion wird über 24 Stunden bei 4°C durchgeführt.

Der Knochen wird anschließend in sterilem destillierten Wasser für 12

Stunden bei 4°C gewaschen, wobei ein mehrfacher Wasserwechsel durchgeführt wird. Lipide sowie Lipoproteine der Zellmembran werden über 24

Stunden mittels einer 1:1 Mischung aus Chloroform-Methanol extrahiert.

Ein zusätzlicher Effekt dieser Behandlung besteht in der Inhibition sowie Extraktion endogener, BMPs abbauender Enzyme. Nach Abgießen der

Chloroform-Methanollösung wird der Knochen unter sterilen Bedingungen getrocknet. Schließlich wird der Knochen wiederum mit sterilem, deionisierten Wasser für 4 Stunden bei 4°C gewaschen und anschließend tiefgefroren und danach für 10 Tage lyophilisiert und schließlich steril verpackt. Hieran kann sich noch eine Gamma-Sterilisation anschließen.

20

25

In Stichworten gestaltet sich das erfindungsgemäße Herstellungsverfahren für Knochenstücke wie folgt:

- Bei -80°C tiefgefroren gelagerten Knochen in Aqua dest. mit 2,0 mM Natriumazid auftauen.
 - 2 Knochenenden entfernen.
 - 3 Knochen von Weichgeweben befreien.
 - 4 Knochenstücke mittels Kürette von Knochenmark befreien.

- 5 Knochen in gewünschte Größe sägen.
- Knochen mit starkem, kaltem Wasserstrahl von Knochenmark befreien, Knochen nicht austrocknen lassen, in Aqua dest, 4°C, mit 2,0 mM Natriumazid 2,0 mM N-Ethylmaleinimid und 0,1 mM
- 5 Benzamidin-HCl lagern.
 - 7 Entfetten durch ein Bad in Chloroform/Methanol 1:1 bei RT, 4 h.
 - 8 Evaporieren für ca 1 h.
 - Demineralisierung mit 0,6 M HCl bei 4°C für 2 bis 16 h je nach gewünschtem Demineralisierungsgrad (am nächsten Tag Röntgen-
- 10 kontrolle).

- Oberste Schicht des demineralisierten Knochens und noch anhaftendes Weichgewebe entfernen.
- 11 Waschen mit Aqua dest. bei 4°C für 1 h.
- 12 Knochen für 6 h in 0,1 M Phosphatpuffer, pH 7,4 mit 3,0 mM N-15 ethylmaleinimid und 10,0 mM Natriumazid bei 37°C im Wasserbad inkubieren.
 - Mit Aqua dest, für 2-4 h bei 4°C waschen und das Aqua dest. zweimal wechseln.
- 14 Für 24 Std mit 6.0 M LiCl/0,3 M CaCl₂ mit 3,0 mM Natriumazid bei 4°C inkubieren.
 - 15 Mit Aqua dest. 12 bis 24 h bei 4°C waschen und das Aqua dest. mindestens zweimal wechseln.
 - Abtöten von Keimen und Sporen durch Desinfektion bzw. Chemo-Sterilisation sowie Extraktion zellulärer Abbauprodukte mittels Chloroform/Methanol (1:1) bei Raumtemperatur für 24 h.
 - 17 Evaporieren für ca. 2-3 h.
 - Mit sterilem Aqua dest. für 4 h bei 4 °C waschen, das Wasser zweimal wechseln.

- 19 Lyophilisieren für 10 Tage; anschliessend Sterilproben prüfen.
- 20 Knochenstücke steril verpacken.
- 21 Eventuell Sterilisierung mittels Gamma-Sterilisation bei 3 MRad.
- 5 Es sei darauf hingewiesen, daß die oben genannten Schritte 10 bis 18 grundsätzlich in ihrer Reihenfolge vertauscht werden können.

Ein Herstellungsverfahren für Knochenpulver gestaltet sich gemäß der Erfindung wie folgt:

- 1 Knochen in Aqua dest. Mit 2,0 mM Natriumazid (0,13 g auf 1 l) auftauen.
- 2. Knochen von Weichgewebe befreien.
- 3 Knochen in kleine Stücke sägen.
- 15 4 Knochenstücke von Knochenmark befreien und unter kaltem Wasser nochmals säubern.
 - 5 Knochen nicht austrocknen lassen, in Aqua dest, 4°C, mit 10,0 mM Natriumazid 3,0 mM N-Ethylmaleinimid lagern.
- 6 Mit der Knochenmühle unter Verwendung von flüssigem Stickstoff 20 grob mahlen (ca. 2,0 mm Korngröße).
 - 7 Entfetten durch ein Bad in Chloroform/Methanol 1:1 bei RT, für 1 bis 4 h.
 - 8 Evaporieren für ca 1 h.
- 9 Auf die gewünschte Größe (ca 0,5 mm Korngröße) mahlen unter 25 Kühlung, z.B. durch flüssigen Stickstoff.
 - Demineralisierung mit 0.6 N HCl bei 4°C über Nacht (am nächsten Tag Röntgenkontrolle).
 - 11 Waschen mit Aqua dest. bei 4° C für 1 h.

10

20

- Pulver für 6 Stunden in 0,1 M Phosphatpuffer, pH 7,4 mit 3,0 mM N-ethylmaleinimid und 10,0 mM Natriumazid bei 37° C im Wasserbad inkubieren.
- Mit Aqua dest. 10 mM Natriumazid und 3,0 mM N-Ethylmaleinimid für 4 h bei 4°C waschen und das Aqua dest. zweimal wechseln.
 - Für 24 h mit 6,0 M LiCl /0,3 M CaCl₂ mit 3,0 mM Natriumazid bei 4°C inkubieren.
 - Mit Aqua dest. 10 mM Natriumazid und 3,0 mM N-Ethylmaleinimid den ganzen Tag bei 4°C waschen und Aqua dest. mindestens zweimal wechseln.
 - Abtöten von Keimen und Sporen durch Desinfektion bzw. Chemo-Sterilisation sowie Extraktion zellulärer Abbauprodukte mittels Chloroform/Methanol (1:1) bei Raumtemperatur für 24 h.
 - 17 Evaporieren für ca 1 h.
- 15 18 Mit sterilem Aqua dest. für 1 h bei 4° C waschen.
 - 19 Lyophilisieren.
 - 20 Nach 10 Tagen Sterilproben prüfen.
 - 21 Pulver steril verpacken.
 - 22 Eventuell Sterilisierung mittels Gamma-Sterilisation bei 3 MRad.

Auch hier sind die oben genannten Schritte 11 bis 18 grundsätzlich in ihrer Reihenfolge vertauschbar.

Die nachfolgenden Tabellen zeigen den Einfluß verschiedener Verfahrensparameter auf die Osteoblastenaktivität (alkalische Phosphatase (AP)).

Tabelle 1A zeigt die Abhängigkeit der Osteoblastenaktivität (alkalische Phosphataseaktivität (AP)) nach 10- bzw. 15- tägiger Implantation sowie

der osteoinduktiven Potenz nach 4-wöchiger heterotroper, d.h. intramuskulärer Implantation in Ratten von der Expositionsdauer des AAA-Knochens gegenüber Phosphatpuffer in Kombination mit den genannten Enzyminhibitoren (3,0 mmol/l N-Ethylmaleinimid und 10 mmol/l Natriumazid bei 37°C) während der Autolyse:

Tabelle 1A

| | Histologie / | Osteoinduktion | 5/6 | 3/4 | 4/6 | 9/9 | 5/6 |
|--------------------|----------------|--------------------------|----------------|----------------|----------------|--------------------|---------------|
| | AP (U) 15 Tage | $\overline{X} \pm SD(n)$ | 68.4 ± 4.9 (5) | 76.0 ± 9.9 (6) | 28.3 ± 6.8 (6) | 12.2 ± 3.1 (6) | 7.5 ± 2.6 (6) |
| | AP (U) 10 Tage | $\overline{X} \pm SD(n)$ | 41.4 ± 5.7 (6) | 1 | 22.5 ±4,9 (6) | 14.6 ± 3.5 (6) | 5.5 ± 1.2 (6) |
| Einwirkzeit (Std.) | von 0,1 mol/1 | Na-Phosphat, pH 7,4 | 1 | 9 | 24 | . 72 | 168 |

Wie Tabelle 1A zeigt, wirkt sich eine über 6 Stunden hinausgehende Einwirkzeit in der Phosphatpufferlösung nicht vorteilhaft auf die Osteoblastenaktivität aus. Zudem kann durch eine Verringerung der bislang gewählten Einwirkzeit von 72 Stunden auf 6 Stunden eine Steigerung der
Osteoblastenaktivität auf das über 6-fache erzielt werden (nach 15-tägiger
Implantation).

Tabelle 1B zeigt die Abhängigkeit der Osteoblastenaktivität (alkalische Phosphatase (AP)) nach 10- bzw. 15-tägiger Implantation sowie der osteo-induktiven Potenz nach 4- wöchiger heterotroper, d.h. intramuskulärer Implantation in Ratten von der Expositionsdauer des AAA-Knochens gegenüber der neutralen Phosphatpufferlösung in Kombination mit unterschiedlichen Konzentrationen an Enzyminhibitoren:

abelle 1B

| | | | | | | | | | | | r | | | |
|-------------------|------------------|--------------------------|----------------|-------------------|-----------------------|---------------|-----------------|-------------------|------------------------|---------------|-----------------|-------------------|-----------------------|---------------|
| | Histologie | Osteoinduktion | 3/4 | 4/6 | 9/9 | 9/9 | 4/4 | 2/3 | 2/3 | 3/4 | 4/4 | 4/4 | 4/4 | 2/4 |
| | AP (U) 15 Tage | <u>X</u> ± SD (n) | 76.0 ± 9.9 (6) | 28.3 ± 6.8 (6) | 12.2 ± 3.1 (6) | 7.5 ± 2.6 (6) | 71.8 ± 13.1 (4) | 22.5 ± 4.9 (5) | 20.3 ± 5.8 (5) | 6.5 ± 1.2 (6) | 47.3 ± 23.1 (5) | 13.7 ± 1.9 (6) | 8.3 ± 0.8 (5) | 4.7 ± 0.6 (6) |
| | AP (U) 10 Tage | $\overline{X} \pm SD(n)$ | • | 22,5 ±4.9 (5) | 14,6 ±3,5 (6) | 5.5 ± 1,2 (5) | 1 | • | , | • | 1 | ı | • | • |
| Einwirkzeit (Std) | 0,1 mol/1 Na- | Phosphat, pH 7,4 | 9 | 24 | 72 | 168 | 9 . | 24 | 72 | 168 | 9 | 24 | 72 | 168 |
| Konzentration | Enzyminhibitoren | | 3 mmol/1 | N-ethylmaleinimid | 10 mmol/l Natriumazid | | 30 mmol/1 | N-ethylmaleinimid | 100 mmol/l Natriumazid | | 300 mmol/l | N-ethylmaleinimid | 1000 mmol/l Natriuma- | zid |

Wie Tabelle 1B zeigt, wird die Osteoblastenaktivität durch eine erhöhte Konzentration an Enzyminhibitoren während der Autolyse in neutraler Phosphatpufferlösung nicht gesteigert. Auch wirkt sich eine über 6 Stunden hinausgehende Einwirkzeit in der Phosphatpufferlösung nicht positiv auf die Osteoblastenaktivität (nach 15-tägiger Implantation) aus.

Tabelle 2 zeigt den Einfluß von Lösungsmittelgemischen, eingesetzt zur Entfettung und Chemosterilisation, auf die Osteoblastenaktivität (alkalische Phosphatase (AP) und Osteoinduktion) nach 4-wöchiger heterotroper, d.h. intramuskulärer Implantation in Ratten sowie der Chondroinduktion nach 14-tägiger Einwirkung auf neonatale Rattenmuskulatur in vitro:

Tabelle 2

| Chemosterilisation 24 h | | | |
|-------------------------|--------------------------|----------------|---------------------------|
| mit 50% Methanol und | AP (U) 10 Tage | Histologie | |
| 20% | $\overline{X} \pm SD(n)$ | Osteoinduktion | Chondroinduktion in vitro |
| Chloroform | 55.9 ±24.8 (6) | 12/15 | 4/6 |
| Aceton | 10.3 ±2.8 (6) | 12/22 | 1/3 |
| Äther | 18.2 ±4.7 (5) | 11/16 | 8/8 |
| | | | |

WO 00/25839 PCT/EP99/08056

20 Ansprüche

- 1. Verfahren zur Präparation von Knochenmaterial zur Wiederherstellung von knöchernen Defekten in der Chirurgie, umfassend folgende Schritte:
 - Demineralisieren von vorzugsweise kortikalem Knochenmaterial,

5

15

autolytischer Abbau der Knochenzellen des
demineralisierten Knochenmaterials unter Erhaltung der
osteoinduktiven Matrixproteine durch Waschen in einer
Phosphatpufferlösung unter Zuführung von Enzyminhibitoren,

dadurch gekennzeichnet, daß die Verweilzeit in der Pufferlösung 24 Stunden nicht überschreitet.

- Verfahren nach Anspruch 1,
 dadurch gekennzeichnet, daß
 die Verweilzeit nicht mehr als etwa 10 Stunden, vorzugsweise
 etwa 6 Stunden beträgt.
- Verfahren nach Anspruch 1,
 dadurch gekennzeichnet, daß
 der Demineralisierung eine Entfettung, vorzugsweise unter Verwendung einer Methanolmischung, vorausgeht.
 - Verfahren nach Anspruch 1,dadurch gekennzeichnet, daßsich an die Demineralisierung eine Chemosterilisation, vor-

zugsweise unter Verwendung einer Methanolmischung, anschließt.

- Verfahren nach Anspruch 3 oder 4,
 dadurch gekennzeichnet, daß
 die Methanolmischung neben Methanol Äther oder Chloroform
 aufweist.
- Verfahren nach Anspruch 1,
 dadurch gekennzeichnet, daß

 das erhaltene Knochenmaterial einer Gamma-Sterilisation unterworfen wird.
- Verfahren nach Anspruch 1,
 dadurch gekennzeichnet, daß
 das Knochenmaterial vor der Demineralisierung unter Verwendung von flüssigem Stickstoff zu Pulver gemahlen wird.
- 8. Verfahren nach Anspruch 1,
 20 dadurch gekennzeich net, daß
 das Knochenmaterial vor der Demineralisierung ohne Erhitzung
 über 40°C zu Pulver gemahlen wird.
- 9. Knochenmaterial, erhältlich durch ein Verfahren nach25 zumindest einem der vorstehenden Ansprüche.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Inter anal Application No PCT/EP 99/08056

| A. CLASSI IPC 7 | FICATION OF SUBJECT MATTER A61L27/36 | | |
|---------------------|--|--|------------------------|
| According to | o International Patent Classification (IPC) or to both national classifica | ation and IPC | |
| B. FIELDS | SEARCHED | | |
| Minimum do IPC 7 | cumentation searched (classification system followed by classification A61L | on symbols) | |
| Documentat | ion searched other than minimum documentation to the extent that s | uch documents are included in the fields se | arched |
| Electronic d | ata base consulted during the international search (name of data base) | se and, where practical, search terms used | |
| C. DOCUM | ENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT | | |
| Category ° | Citation of document, with indication, where appropriate, of the rele | evant passages | Relevant to daim No. |
| Х | US 5 112 354 A (SIRES BRYAN S) 12 May 1992 (1992-05-12) | | 1-5,9 |
| Y | column 1, line 30 - line 48 column 5, line 34 -column 6, line | . 55 _. | 6-8 |
| Y | WO 96 39203 A (BIOCOLL LAB INC) 12 December 1996 (1996-12-12) page 1, line 17 - line 31 page 23, line 32 -page 24, line 6 | ; | . 6 |
| Y | US 4 472 840 A (JEFFERIES STEVEN 25 September 1984 (1984-09-25) column 2, line 38 - line 68 example 1 | | 7,8 |
| | _ | ·/ | |
| | , | | |
| | · | | |
| X Furt | her documents are listed in the continuation of box C. | X Patent family members are listed | in annex. |
| * Special ca | stegories of cited documents : | "T" later document published after the inte | mational filing date |
| | ent defining the general state of the art which is not tered to be of particular relevance | or priority date and not in conflict with cited to understand the principle or the invention | the application but |
| 1 | document but published on or after the international | "X" document of particular relevance; the c cannot be considered novel or cannot | laimed invention |
| "L" docume | ant which may throw doubts on priority claim(s) or is cited to establish the publication date of another | involve an inventive step when the do "Y" document of particular relevance; the c | cument is taken alone |
| citatio | n or other special reason (as specified) ent referring to an oral disclosure, use, exhibition or | cannot be considered to involve an involvement is combined with one or mo | ventive step when the |
| other | ent published prior to the international filing date but | ments, such combination being obvious in the art. | us to a person skilled |
| later ti | han the priority date claimed | "&" document member of the same patent | |
| Date of the | actual completion of the international search . | Date of mailing of the international sea | иси героп |
| 9 | February 2000 | 17/02/2000 | · |
| Name and | mailing address of the ISA European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 | Authorized officer | |
| | NL - 2280 HV Rijawijk Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl, Fax: (+31-70) 340-3016 | Diederen, J | |

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Inter. Inal Application No PCT/EP 99/08056

| Continu | ation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT | |
|-----------|--|-----------------------|
| ategory * | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages | Relevant to claim No. |
| | GLOWACKI, J. ET AL.: "Demineralized Bone Implants" CLINICS PLASTIC SURGERY, vol. 12, no. 2, April 1985 (1985-04), pages 233-241, XP000874409 page 235, column 2, line 18 -page 236, column 2, line 9 | ; : |
| | . · · · · | |
| | | |
| | . • | · |
| | | |
| | · | |
| | | |
| | | |
| | | |
| | | |
| | | |
| | | : |
| | | |

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

information on patent family members

Inter onal Application No PCT/EP 99/08056

| Patent document cited in search report | | | | atent family member(s) | Publication date | |
|--|---|------------|----------------------|--|--|--|
| US 5112354 A | | 12-05-1992 | NONE | | | |
| WO 9639203 | Α | 12-12-1996 | AU CA CN EP | 6107496 A 2222626 A 1192700 A 0851772 A | 24-12-1996 12-12-1996 09-09-1998 08-07-1998 | |
| US 4472840 | Α | 25-09-1984 | US | 4394370 A | 19-07-1983 | |

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Inter onales Aktenzeicher PCT/EP 99/08056

| A. KLASSI IPK 7 | Fizierung des anmeldungsgegenstandes A61L27/36 | | |
|----------------------------------|--|--|---|
| Nach der in | ternationalen Patentklassifikation (IPK) oder nach der nationalen Kk | assifikation und der IPK | |
| | RCHIERTE GEBIETE | · | |
| Recherchie IPK 7 | rter Mindestprüstoff (Klassifikationssystem und Klassifikationssymb A61L | ole) | |
| Recherchie | nte aber nicht zum Mindestprüfstoff gehörende Veröffentlichungen, s | oweit diese unter die recherchierten Gebiete | fallen |
| Währand de | or internationalen Recherche konsultierte elektronische Datenbank (| Name der Datenbank und aut varwandete S | (uchheoritte) |
| | | | ca acquiric) |
| C. ALS WE | SENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN | | |
| Kategorie* | Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angab | e der in Betracht kommenden Teile | Betr. Anspruch Nr. |
| X | US 5 112 354 A (SIRES BRYAN S) 12. Mai 1992 (1992—05—12) | | 1-5,9 |
| Y | Spalte 1, Zeile 30 - Zeile 48 Spalte 5, Zeile 34 -Spalte 6, Ze | i1e 55 | 6-8 |
| Y | WO 96 39203 A (BIOCOLL LAB INC) 12. Dezember 1996 (1996-12-12) Seite 1, Zeile 17 - Zeile 31 Seite 23, Zeile 32 -Seite 24, Zei | ile 6 | 6 |
| Υ . | US 4 472 840 A (JEFFERIES STEVEN 25. September 1984 (1984-09-25) Spalte 2, Zeile 38 - Zeile 68 Beispiel 1 | R) | 7,8 |
| | - | -/ | |
| 1 | | | |
| | ere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu ehmen | Siehe Anhang Patentfamilie | |
| * Besondere "A" Veröffer | Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen : ntlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, cht als besonders bedeutsam anzusehen ist | T* Spätere Veröffentlichung, die nach dem i oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht v Anmeldung nicht kollidiert, sondem nur | vorden ist und mit der zum Verständnis des der |
| "E" älteres (| Dokument, das jedoch erst am oder nach dem internationalen dedatum veröffentlicht worden ist | Erfindung zugrundellegenden Prinzips o Theorie angegeben ist | |
| "L" Veröffen schein andere | itlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft er- en zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer en im Recherchenbericht genammen Veröffentlichung belegt werden | "X" Veröffentlichung von besonderer Bedeut kann allein aufgrund dieser Veröffentlich erlinderischer Tätigkeit beruhend betrac "Y" Veröffentlichung von besonderer Bedeutt | ung nicht als neu oder auf |
| ausgel | ührl) | kann nicht als auf erfinderischer Tätigke werden, wenn die Veröffentlichung mit e | t beruhend betrachtet |
| eine Br "P" Veröffer | ntlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, enutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen be zieht stlichung, die vor dem internationalen Anmeldedatum, aber nach sanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist | Veröffentlichungen dieser Kategorie in V diese Verbindung für einen Fachmann n "&" Veröffentlichung, die Mitglied derselben F | erbindung gebracht wird und aheliegend ist |
| | Abschlusses der internationalen Recherche | Absendedatum des internationalen Rech | |
| 9 | . Februar 2000 | 17/02/2000 | |
| Name und P | ostanschrift der Internationalen Recherchenbehörde Europäisches Patentamt, P.B. 5818 Patentlaan 2 | Bevollmächtigter Bediensteter | |
| | NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo ni, Esy: (+31-70) 340-3016 | Diederen, J | |

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Inte onales Aktenzeichen
PCT/EP 99/08056

| Kategorie: | ung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile | Betr. Anspruch Nr. |
|------------|--|--------------------|
| | | |
| | GLOWACKI, J. ET AL.: "Demineralized Bone Implants" CLINICS PLASTIC SURGERY, Bd. 12, Nr. 2, April 1985 (1985-04), Seiten 233-241, XP000874409 Seite 235, Spalte 2, Zeile 18 -Seite 236, Spalte 2, Zeile 9 | |
| | | |
| | | |
| | | |
| | | |
| | | |
| | | |
| | | |
| | | |
| | | |
| | | |
| | | |
| | | |
| | | · |
| | | |
| | | |
| : | | |
| | | |
| | | |
| | | |
| | | |
| | | |
| | | |
| | | |
| | | |
| | | |
| | | |
| | | |
| | | |
| | | |

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Angaben zu Veröffentlichur ven, die zur seiben Patentfamilie gehören

Inter unales Aktenzeichen
PCT/EP 99/08056

| im Recherchenbericht angeführtes Patentdokument | | Datum der Veröffentlichung | | tglied(er) der atentfamilie | Datum der Veröffentlichung |
|--|----|-------------------------------|----------------------|--|--|
| US 5112354 | Α | 12-05-1992 | KEIN | E | |
| WO 9639203 | Α | 12-12-1996 | AU CA CN EP | 6107496 A 2222626 A 1192700 A 0851772 A | 24-12-1996 12-12-1996 09-09-1998 08-07-1998 |
| US 4472840 | Α΄ | 25-09-1984 | US | 4394370 A | 19-07-1983 |